DOI:10.11931/guihaia.gxzw202304019

MSPD-HPLC 法分析云南红豆杉中的 10-DAB Ⅲ和紫杉醇

赵倩倩，朱靖博

(大连工业大学 食品学院，辽宁大连 116023)

摘 要：为建立红豆杉（*Taxus wallichiana* var. *chinensis*）中 10-去乙酰基巴卡亭III（10-DAB III）和紫杉醇（Taxol）的分析方法，该文采用基质固相萃取-高效液相色谱法方法（MSPD-HPLC）对云南红豆杉中的 10-DAB III及 Taxol 进行定量分析，考察包括硅胶、佛罗里硅土、酸性氧化铝、中性氧化铝、碱性氧化铝、C_{18}、C_{18}-ME、C_{18}-G1、C_{18}-HC、Diol、Xamide、Xion 共 12 种样品预处理分散剂及各种分散剂的质量、洗脱剂的种类、洗脱剂的浓度、洗脱剂体积对两种成分分析的影响，并对优化后的条件进行方法学验证，同时与超声提取、热回流提取预处理方法进行比较分析证明其有效性。结果表明：（1）考察的 12 种固相分散剂中，碱性氧化铝具有良好的目标化合物萃取检出量，且当碱性氧化铝与样品的质量比为 3∶1，6 mL 甲醇为洗脱剂洗脱时，10-DAB III和 Taxol 的萃取检出量较高。（2）建立的红豆杉枝叶中 10-DAB III和 Taxol 的分析方法具有良好的线性关系（$r \geqslant 0.999\ 9$），10-DAB III和 Taxol 的检出限与定量限分别介于 0.023 9~0.030 1 $\mu g \cdot mL^{-1}$ 和 0.142~0.178 $\mu g \cdot mL^{-1}$ 之间；3 个水平标准物质浓度加入测定样品回收率的结果显示各目标分析物平均加样回收率在 93.6%~109.0%之间。（3）该方法与超声提取、热回流提取预处理分析结果的比较证明，3 种方法对 2 种紫杉烷类化合物的萃取检出量基本无差别，但 MSPD 法溶剂消耗少、操作简单，分析时间短，净化效率高，可应用于红豆杉原料的快速分析。该文以碱性氧化铝为分散剂应用于云南红豆杉紫杉烷类化合物的萃取，建立了快速、高效的红豆杉中 10-DAB III和紫杉醇的分析方法，为红豆杉中的紫杉烷类化合物的定量分析提供了依据。

关键词：云南红豆杉，10-去乙酰基巴卡亭 III，紫杉醇，基质固相萃取，高效液相色谱分析

中图分类号：O657.32　　文献标识码：A

Determination of 10-DAB Ⅲ and Taxol in *Taxus yunnanensis* by MSPD-HPLC

ZHAO Qianqian, ZHU Jingbo

(*School of Food Science and Technology, Dalian Polytechnic University,*

Liaoning, Dalian 116023，China)

Abstract: This research aimed to establish an accurate analytical methods for the quantification of 10-deacetylbaccatin III (10-DAB Ⅲ) and taxol in *Taxus wallichiana* var. *chinensis*. The method utilized matrix solid-phase dispersion coupled with high performance liquid chromatography for the respective quantification of 10-DAB Ⅲ and Taxol. The influence of various parameters was

基金项目：国家自然科学基金-联合基金项目(U1603285)[Foundation item: Project of Joint Fund of the National Natural Science Foundation of China (No. U1603285)]。

第一作者：赵倩倩(1996-)，硕士研究生，主要从事天然产物化学研究，（E-mail）2413737899@qq.com。

***通信作者：**朱靖博，博士研究生，二级教授，主要从事天然产物化学与利用研究，（E-mail）2817638020@qq.com。

investigated, including the types of solid-phase dispersants (silica gel, florisil, acid alumina, neutral alumina, alkaline alumina, C_{18}, C_{18}-ME, C_{18}-G1, C_{18}-HC, Diol, Xamide, Xion), the mass of the dispersants, and the type, concentration, and volume of the eluent on the analysis of the two components. After optimization of these conditions, the methodology was validated. Additionally, a comparative analysis was conducted with the conventional ultrasonic extraction and hot reflux extraction pretreatment methods to ascertain their effectiveness of our novel method. (1) Results indicated that among the 12 solid-phase dispersants examined, alkaline alumina yielded a superior extraction detection rate for 10-DAB Ⅲ and Taxol when used in a 3：1 ratio with the sample mass and 6 mL of methanol as the eluent. (2) The developed method demonstrated excellent linearity ($r \geq 0.999\ 9$) with detection and quantification limits for 10-DAB III and Taxol ranging from 0.023 9 to 0.030 1 $\mu g \cdot mL^{-1}$ and 0.142 to 0.178 $\mu g \cdot mL^{-1}$, respectively. The average recoveries of the target analytes varied between 93.6% and 109.0%. (3) A comparative analysis revealed negligible differences in extraction detection of the two taxanes between the three methods. However, the MSPD method stood out due to its lower solvent consumption, simple operation, short analysis time and high purification efficiency, making it more suitable for the rapid analysis of *Taxus yunnanensis* raw materials. Therefore, this study presents a rapid and efficient analytical method for the extraction and analysis of 10-DAB Ⅲ and Taxol in *Taxus yunnanensis*, using alkaline alumina as a dispersant, providing a significant contribution to the quantitative analysis of taxanes in this species.

Key words: *Taxus yunnanensis,* 10-DAB Ⅲ, Taxol, MSPD, HPLC

红豆杉（*Taxus wallichiana* var. *chinensis*）为红豆杉科红豆杉属植物，全世界约有 11 种（柏培磊，2012）。红豆杉的主要活性成分是紫杉烷类化合物，其中以 Taxol 和 10-DAB III等最为人们所熟知（王炯等，2017）。紫杉醇对子宫癌、卵巢癌等（Yang & Horwitz, 2017）多种癌症具有良好的疗效，10-DAB III不仅具有抑制肿瘤的作用，同时也是半合成紫杉醇和多烯紫杉醇等抗癌药物的重要前体物（马淑桢等，2006）。因此，快速准确分析红豆杉中这两种成分具有重要的现实意义。

红豆杉中的紫杉烷类化合物分析主要采用 HPLC、UPLC、HPLC-MS、UPLC-MS 法等。不同品种红豆杉原料中的 10-DAB III、三尖杉宁碱、紫杉醇等多种紫杉烷类化合物的含量通常采用 C_{18} 或 Pentafluorophenyl 柱的 HPLC 法分析（Zu et al., 2006； Fu et al., 2009；马生军等，2017；冯永林等，2017；崔海超等，2022）。张静采用 UPLC 分析了红豆杉中的 10-DAB III等 3 个有效成分（张静等，2011）；赵春芳、Luo 建立了 LC-MS-MS 方法分析红豆杉中的紫杉烷类化合物（赵春芳等，2006；Luo et al., 2009）。以上分析方法在分析样本前处理方面采取了传统的回流提取法或超声辅助提取法及在样品净化处理时采用液液萃取、SPE 净化，存在样品需要量大、有毒有机溶剂消耗量多、前处理时间长等缺点（江璐依，2020）。

基质固相萃取（matrix solid phase dispersion，MSPD）法是由 Staren Barker 教授提出的样品分析预处理方法（Barker et al., 1989），适用于固态、半固态或具有一定粘度样品（Barker S A, 2000），对目标化合物具有净化、富集作用，其具有消耗时间少、操作简单等优点。MSPD 方法的原理是利用分析物的分子结构特征及分散剂的不同性质，通过研钵将样品及分散剂磨碎并混匀，再用洗脱剂洗脱后进行定量分析。目前，MSPD 已经广泛应用到食品药物残留测定、天然产物和药物的提取和分析中。刘雷等（2020）采用 MSPD-UPLC 法同时测定狼毒大戟中 4 种成分；Wei 等（2011）以碱性氧化铝为分散剂，用乙腈-水混合溶液洗脱，采用 MSPD-HPLC 法对草乌中的 4 种生物碱进行分析、净化；Lu 等（2011）采用在线 MSPD-HPLC/MS 法，用于分析草鱼中的药物残留；Li 等（2014）基于磁性 Fe_3O_4 纳米粒子结合气质联用技术，构建了果蔬中 101 种农药的残留检测方法，同时研究比较了不同基质固相萃取条件对样品的净化效果。

本研究以云南红豆杉枝叶为对象，基于 MSPD-HPLC 快速分析红豆杉中的 10-DAB III和 Taxol 含量，通过考察和优化影响 10-DAB III及 Taxol 萃取检出量的各因素，并与超

声提取法和热回流提取预处理法进行比较分析，拟探讨以下问题：（1）MSPD-HPLC 分析红豆杉中的 10-DAB III及 Taxol 的分散剂选择与优化。（2）选定的分散剂分析 10-DAB III及 Taxol 时的萃取条件优化。（3）新构建分析方法的方法学验证及其适用性。（4）MSPD 法与超声提取法、热回流提法等前处理方法进行比较分析确定方法的有效性。

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

AC Chrom S6000 型高效液相色谱分析仪（北京华谱新创科技有限公司），12 mL 固相萃取柱（湖北苏林科技有限公司），600Y 型多功能粉碎机（广州旭朗设备有限公司），Bmnson 3800 型超声波清洗器（巩义市英裕高科仪器厂）。

10-DAB III（99%）、Taxol（99%）购自西安天丰生物科技有限公司。硅胶、佛罗里硅土来自北京华谱新创科技有限公司，均为 200~300 目；C_{18}、C_{18}-ME、C_{18}-G1、C_{18}-HC、Diol、Xamide、Xion 来自北京华谱新创科技有限公司，粒径均为 10 μm；Alkaline alumina、Acidic alumina、Neutral alumina 来自上海陆都化学试剂厂，均为 200~300 目；色谱级甲醇、乙腈购自天津市科密欧化学试剂有限公司；分析级甲醇、乙腈、乙醇、丙酮购自天津康科德科技有限公司。红豆杉枝叶采自云南保山地区的 *Taxus yunnanensis* 驯化栽培种。

1.2 实验方法

1.2.1 样品制备

将红豆杉枝叶用粉碎机粉碎，过 40 目筛。在 50 ℃烘箱内干燥至恒重并保存在玻璃干燥器中，备用。

1.2.2 标准品溶液制备

称取对照品适量于甲醇中溶解，配制成浓度均 0.1 $mg\cdot mL^{-1}$ 的 10-DAB III、Taxol 混合标准品溶液，0.22 μm 微孔滤膜过滤，用于 HPLC 分析。

1.2.3MSPD 法

称取 0.25 g 红豆杉粉末与正相色谱填料（硅胶、佛罗里硅土、碱性氧化铝、酸性氧化铝、中性氧化铝）、反相色谱填料（C_{18}-HC、C_{18}-G1、C_{18}、C_{18}-ME）、HILIC 填料（Xion、Xamide、Diol）按一定比例混合，并充分研磨。将研磨后的混合样品转移至萃取柱中，萃取柱上、下两端放置筛板，充分压实；加入甲醇，常压洗脱，将洗脱后得到的溶液收集至 25 mL 容量瓶，甲醇定容，0.22 μm 滤膜过滤，用于定量分析，所有实验重复 3 次。

1.2.4 不同预处理方法比较

1、超声提取法：称取红豆杉样品 0.25 g，于 20 mL 甲醇中超声提取 1 h，甲醇定容至 25 mL，混匀后，经滤膜过滤，进行定量分析。

2、热回流提取法：称取红豆杉样品 0.25 g，置于 100 mL 锥形瓶中，加入 25 mL 甲醇热回流提取 1 h，提取 3 次。过滤、浓缩后转移至 25 mL 容量瓶内，经滤膜过滤，用于定量分析。

3、MSPD 法：确定最佳萃取条件后，比较基于 MSPD 法萃取的红豆杉中 10-DAB III及 Taxol 萃取检出量及净化效果，方法同“1.2.3”项。

1.2.5 色谱条件

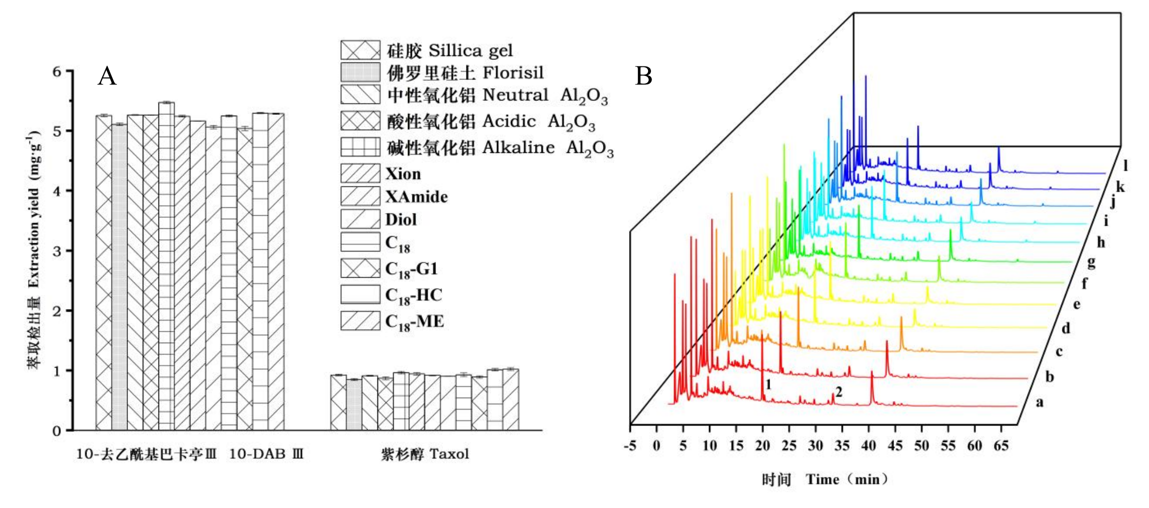
C_{18} 色谱柱（4.6 mm×250 mm，5 μm）；流动相：乙腈（A）-水（B），梯度洗脱：0~20 min，15% A-50% A；20~60 min，50%~100% A；60~65 min，100%~10% A；65~67 min，10% A-15% A；体积流量：0.8 $mL\cdot min^{-1}$；检测波长：227 nm；柱温：30 ℃；进样量：10 μL。

2 结果与分析

2.1 萃取条件优化

2.1.1 分散剂的选择

基质固相分散剂是 MSPD 吸附法进行样品预处理过程中影响目标化合物分析准确性的主要因素，考察了正相色谱填料（硅胶、佛罗里硅土、碱性氧化铝、酸性氧化铝、中性氧化铝）、反相色谱填料（C_{18}-HC、C_{18}-G1、C_{18}、C_{18}-ME）、HILIC 填料（Xion、Xamide、Diol）12 种分散剂对红豆杉紫杉烷类化合物分析的影响。从图 1 可以看出，12 种分散剂对目标分析物具有相似的萃取检出量，HILIC 填料（Xion、Xamide、Diol）对于紫杉烷类化合物的萃取检出量略低于正相色谱填料和反相色谱填料，这与 HILIC 填料与极性化合物是通过氢键作用或者偶极-偶极作用相互吸附（李欣等，2020），对极性相对较弱的 10-DAB III 和 Taxol 吸附较差有关。12 种分散剂对目标化的吸附性能差异不大，但是正相色谱填料对于目标化合物的吸附性较高，其中碱性氧化铝的萃取检出量高于其它分散剂，可能是因为碱性氧化铝可反应性的吸附其中的极性化合物，而弱极性化合物紫杉烷类化合物并未有损失（陈驰，2020），适合于极性相对较弱的紫杉烷类化合物的净化、富集，因此，选择碱性氧化铝为分散剂。



注：**a**. 硅胶；**b**. 佛罗里硅土；**c**. 碱性氧化铝；**d**. 酸性氧化铝；**e**. 中性氧化铝；**f**. Xion；**g**. XAmide；**h**. Diol；**i**. C_{18}-HC；**j**. C_{18}-G1；**k**. C_{18}；**l**. C_{18}-ME；**1**. 10-去乙酰基巴卡亭 III；**2**. 紫杉醇。

Note: **a**. Silica gel；**b**. Florisil；**c**. Alkaline alumina；**d**. Acidic alumina；**e**. Neutral alumina；**f**. Xion；**g**. XAmide；**h**. Diol；**i**. C_{18}-HC；**j**. C_{18}-G1；**k**. C_{18}；**l**. C_{18}-ME；**1**. 10-DAB III；**2**. Taxol.

图 1 分散剂对目标分析物萃取检出量影响（A）和不同分散剂条件下云南红豆杉萃取物色谱图（B）

Fig. 1 Effects of different adsorbents on extraction yield of target analyte (A) and chromatograms of *Taxus wallichiana* var. *chinensis* extract with different adsorbents (B)

2.1.2 样品与碱性氧化铝分散剂质量比的影响

考察了样品与碱性氧化铝的不同质量比（2∶1、1∶1、1∶2、1∶3、1∶4、1∶5）对 10-DAB III及 Taxol 萃取检出量的影响。从图 2 可以看出，质量比从 2∶1 上升到 1∶5 时，10-DAB III及 Taxol 萃取检出量明显提高，质量比为 1∶3 时萃取检出量存在一个最佳值，显然分散剂增大会使样品组分和分散剂之间的界面面积增加，提高目标分析物的分析收萃取检出量（郭芸等，2020）。但分散剂质量的进一步增加会使目标分析物不易从萃取柱中被完全洗脱，从而使萃取检出量降低，此外，考虑到填充物较多会导致其分散不均匀，因此，选择红豆杉与碱性氧化铝的质量比为 1∶3。

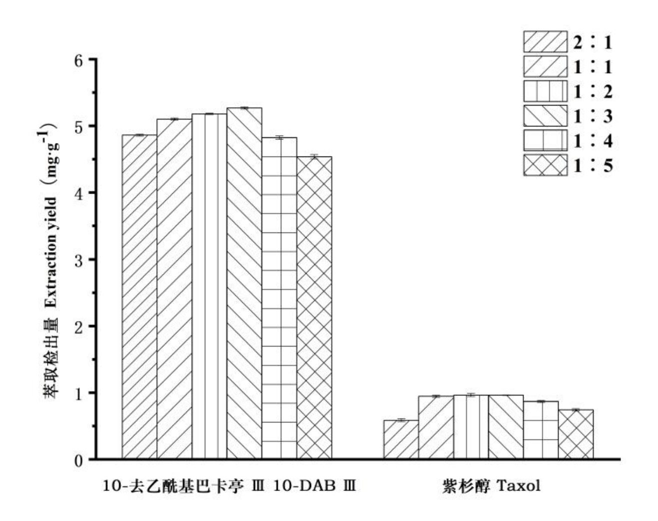
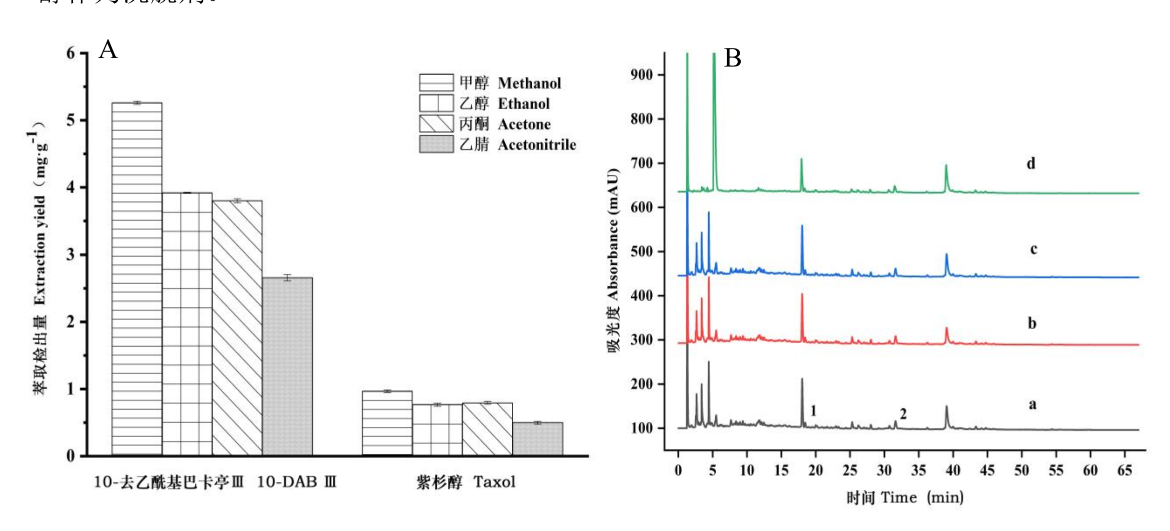


图 2 样品与分散剂质量比对目标分析物萃取检出量的影响

Fig. 2 Effects of the sample-to-adsorbent mass ratio on extraction yield of target analyte

2.1.3 洗脱剂种类的影响

在碱性氧化铝作为分散剂的吸附与解析过程中，极性强的洗脱剂有利于将分析物从分散剂上洗脱下来。分别考察了甲醇、乙醇、乙腈、丙酮四种溶剂对 10-DAB III及 Taxol 的洗脱能力，结果显示，4 种洗脱剂对目标化合物均具有一定的洗脱作用，当甲醇作为洗脱剂时，2 种目标分析物的萃取检出量明显高于其他 3 种洗脱剂，2 种目标分析物的萃取检出量较高，这说明甲醇更适合从碱性氧化铝中解析 10-DAB III及 Taxol。因此，选择甲醇作为洗脱剂。



a. 甲醇；**b**. 乙醇；**c**. 乙腈；**d**. 丙酮；**1**. 10-去乙酰基巴卡亭 III；**2**. 紫杉醇。

a. methanol；**b**. ethanol；**c**. acetonitrile；**d**. acetone；**1**. 10-DAB III；**2**. Taxol.

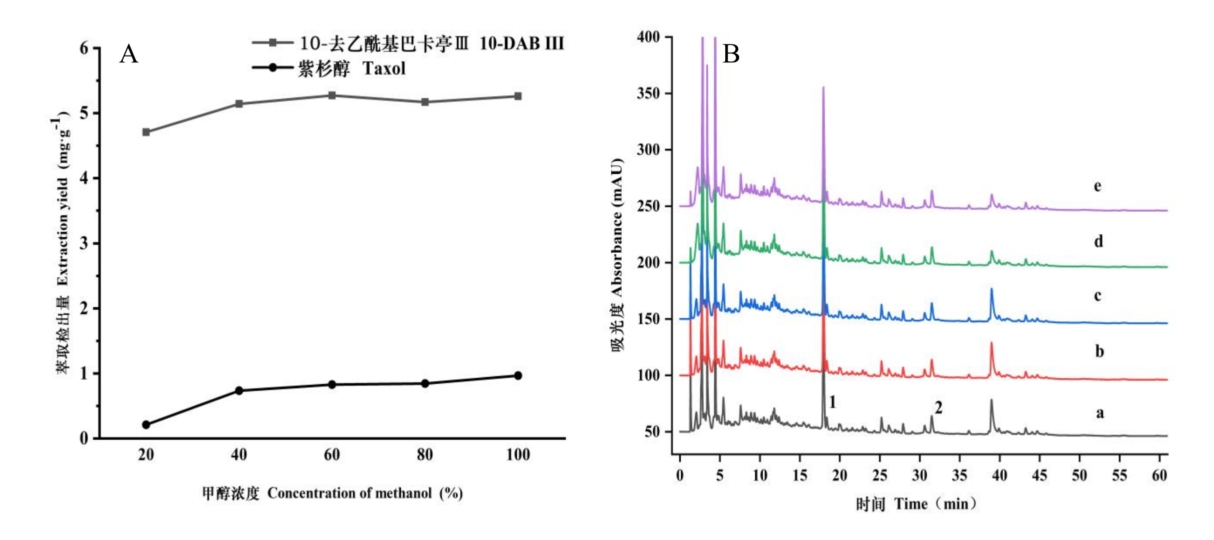
图 3 洗脱剂种类对目标分析物萃取检出量影响（A）和不同洗脱剂条件下云南红豆杉萃取物色谱图（B）

Fig. 3 Effects of different elution solvents on extraction yield of target analyte (A) and chromatograms of*Taxus wallichiana* var. *chinensis* extract with different elution solvents(B)

2.1.4 洗脱剂浓度的影响

洗脱剂浓度对目标化合物的萃取检出量有一定影响，考察了不同浓度的甲醇（20%、40%、60%、80%、100%）对 2 种目标化合物萃取检出量的影响，结果如图 4。随着甲醇浓度的增大，2 种目标化合物的萃取检出量也逐渐增大。当浓度达到 40%时，随着甲醇浓度

的增大，萃取检出量变化不大，但随着甲醇浓度的降低，洗脱时间也相应增加，可能是因为洗脱剂中水的存在会导致溶剂的粘度变大（陈驰，2020）。在洗脱效果相同情况下，以100%甲醇为洗脱剂可缩短洗脱时间，选择 100%甲醇作为洗脱剂浓度。



甲醇浓度 **a**. 20%甲醇；**b**. 40% 甲醇；**c**. 60% 甲醇；**d**. 80% 甲醇；**e**. 100% 甲醇；**1**. 10-去乙酰基巴卡亭 III；**2**. 紫杉醇。

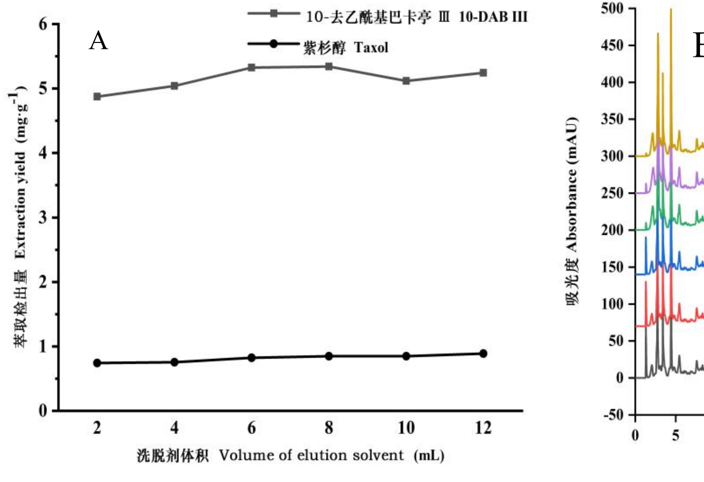
Concentration of methanol **a**. 20% methanol；**b**. 40 % methanol；**c**. 60% methanol；**d**. 80% methanol；**e**. 100% methanol；**1**. 10-DAB III；**2**. Taxol.

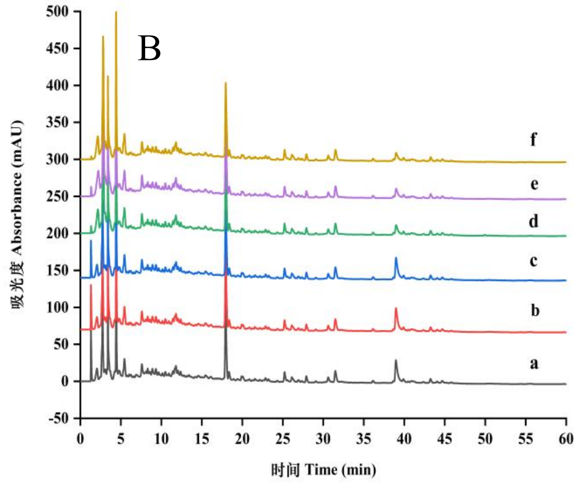
图 4 洗脱剂浓度对目标分析物萃取检出量影响（A）和不同洗脱剂浓度下云南红豆杉萃取物色谱图（B）

Fig. 4 Effects of elution solvent concentration on extraction yield of target analyte (A) and chromatograms of *Taxus wallichiana* var. *chinensis* extract with different elution solvent concentration(B)

2.1.5 洗脱溶剂体积的影响

洗脱溶剂体积是 MSPD 吸附分离中的关键参数，在提取完全的基础上，应尽量减少洗脱剂的用量。考察了甲醇的洗脱体积（2、4、6、8、10、12 mL）对萃取检出量的影响。从图 5 可以看出，当甲醇从 2 mL 增加至 6 mL 时，目标化合物萃取检出量逐渐增加。当洗脱体积为 6 mL 时，萃取检出量达到最大，且随着洗脱体积的增大，萃取检出量没有明显提高。因此，选择 6 mL 作为目标分析物的洗脱体积。





甲醇体积: **a**. 2 mL；**b**. 4 mL；**c**. 6 mL；**d**. 8 mL；**e**. 10 mL；**f**. 12 mL；**1**. 10-去乙酰基巴卡亭III；**2**. 紫杉醇。

Eluent volume of methanol: **a**. 2 mL；**b**. 4 mL；**c**. 6 mL；**d**. 8 mL；**e**. 10 mL；**f**. 12 mL；**1**. 10-DAB III；**2**. Taxol.

图 5 洗脱剂体积对目标分析物萃取检出量影响（A）和不同体积条件下云南红豆杉萃取物色谱图（B）

Fig. 5 Effects of elution solvent volume on extraction yield of target analyte (A) and chromatograms of *Taxus wallichiana* var. *chinensis* extract with different elution solvent volume (B)

2.2 方法学考察

2.2.1 分析方法的线性关系、定量限、检出限考察

量取“1.2.2”项下混合标准品溶液 1.00、0.50、0.30、0.20、0.10 mL，分别置于 10 mL 容量瓶中，甲醇定容，获得 5 个梯度质量浓度的 10-DAB III及 Taxol 混合标准品溶液，分别过 0.22 μm 滤膜，在“1.2.5”项条件下进样。以目标分析物色谱峰面积为纵坐标（*y*），质量浓度为横坐标（*x*）作图，得到回归方程。信噪比（signal to noise ratio，S / N）为 3：1 和 10：1 的质量浓度为目标化合物的检出限和定量限。结果见表 1。从表 1 可以看出，该方法线性相关系数均大于 0.999 9，表明该方法具有良好的线性关系。

表 1 2 种紫杉烷类化合物回归方程、相关系数、检出限、定量限和线性范围

Table 1 Linear equations, correlation coefficients(*R*),LOD,LOQ and linear range of two taxanes

化合物 Compound	回归方程 Calibration curves	R^2	检出限 LOD（$\mu g \cdot mL^{-1}$)	定量限 LOQ（$\mu g \cdot mL^{-1}$)	线性范围 Linear range（$\mu g \cdot mL^{-1}$)
10-DAB III（10-去乙酰基巴卡亭III）	$y= 1.96 \times 10^7x + 1.18 \times 10^3$	0.999 9	0.030 1	0.178	1-10
Taxol（紫杉醇）	$y = 2.49 \times 10^7x + 1.65 \times 10^3$	0.999 9	0.023 9	0.142	1-10

2.2.2 分析方法的精密度、稳定性

取同一 MSPD 样品，在“1.2.5”项条件下，分别于 0、2、4、6、8、10 h 进样，测得目标化合物的日内精密度；分别于 0、24、48 h 进样，测定日间精密度。日内精密度相对标准偏差（relative standard deviation，RSD）分别为 1.3%、1.5%，日间精密度 RSD 分别为 1.1%、1.4%。表明该方法的精密度、稳定性良好。

2.2.3 分析方法的加样回收率试验

在 3 个浓度水平（50%、100%、150%）下对样品中 10-DAB III、Taxol 的进行加样回收率测试，得到 3 个浓度水平的加标样品回收率在 93.6%~109.0%之间，RSD 在 1.2%~3.2%之间，结果见表 2。

表 2 2 种紫杉烷类化合物的加标回收率和相对标准偏差(n=3)

Table 2 Recoveries and relative standard deviations of two taxanes (n=3)

化合物 Compound	原有量 Background（μg）	加入量 Added（μg）	测得量 Found（μg）	回收率 Recovery（%）	相对标准偏差 RSD（%）
10-DAB III（10-去乙酰基巴卡亭III）	55.9	25.7	76.4 ± 0.025	93.6	2.3
		50.2	108.6 ± 0.012	102.4	1.2
		100.8	170.8 ± 0.044	109.0	2.6
Taxol（紫杉醇）	7.5	4.2	12.1 ± 0.002	102.6	3.2
		8.6	16.0 ± 0.003	99.4	2.7

12.4	19.6 ± 0.001	98.5	2.1

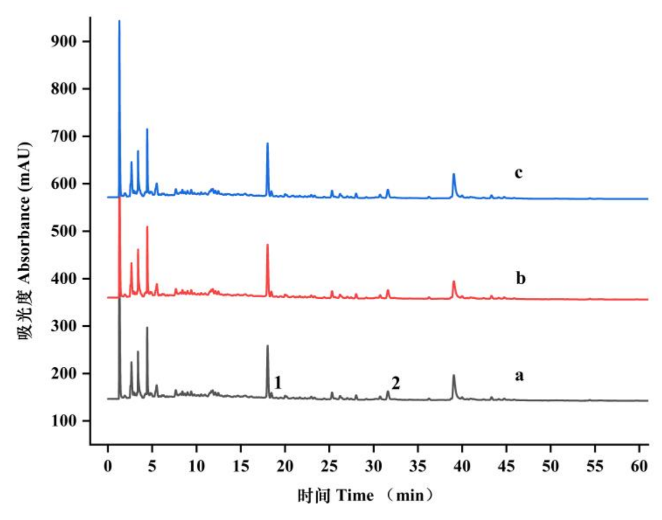
2.3 不同前处理方法比较

以云南红豆杉枝叶为实验样品，比较了优化后的 MSPD 与热回流提取法、超声提取法的分析结果见表 3，从表中可以看出，3 种前处理方法对 10-DAB III及 Taxol 的萃取检出量无显著差异，但是 MSPD 法在提取过程中仅需 6 mL 甲醇、20 min 内即可完成。MSPD 法与两种传统方法相比，MSPD 法操作简单、消耗的溶剂少、耗时短，具有较好的应用前景。

表 3 不同方法测定红豆杉中紫杉烷类化合物萃取检出量结果比较

Table 3 Comparison of different methods for determining the yield of taxanes in *Taxus yunnanensis*

方法 Method	萃取检出量 Extraction yieid（mg·g^{-1}）		样品量 Amount of sample（g）	溶剂量 Amount of solvent（mL）	提取时间 Extraction time（min）	相对标准偏差 RSD（%）
	10-DAB III（10-去乙酰基巴卡亭 III）	Taxol（紫杉醇）				
基质固相分散 Matrix Solid Phase Dispersion	5.47 ± 0.091	0.78 ± 0.009	0.25	6	＜20 min	1.7
热回流提取 Hot Reflux Extraction	5.42 ± 0.074	0.70 ± 0.003	0.25	25	60 min*3	1.3
超声提取 Ultrasonic Extraction	5.44 ± 0.073	0.73 ± 0.008	0.25	25	60 min	1.2



a. 基质固相分散；**b**. 超声提取；**c**. 热回流提取；**1**. 10-去乙酰基巴卡亭 III；**2**. 紫杉醇。

a. matrix solid phase dispersion；**b**. ultrasonic extraction；**c**. hot reflux extraction；**1**. 10-DAB III; **2**. Taxol.

图 6 不同方法提取紫杉烷类化合物的 HPLC 色谱图

Fig. 6 HPLC Chromatogram of taxanes extracted from *Taxus yunnanensis* by different methods

3 讨论与结论

样品的前处理过程对天然产物含量分析有着至关重要的作用。相关文献报道红豆杉中紫杉烷类化合物前处理方法包括超声提取法（Wianowska et al., 2009）、常规溶剂提取（Li et al., 2009）等，但都具有有机试剂消耗大、样品量大、萃取效率低等缺点，不适用于红豆杉中紫杉烷的快速定量分析。MSPD 作为用于复杂基质中微量成分分析的前处理方法，具有简单、快速、经济环保等优点（江璐依，2020），与传统方法相比，消耗时间短，萃取效率高。

基质固相分散剂是影响目标化合物准确性的重要因素，常见的分散剂包括正相色谱分散剂（硅胶、氧化铝、佛罗里硅土等）、反相色谱分散剂（以 C_{18} 为基质）和新型分散剂，其作用原理不同，对样品的吸附性也不同（陈驰，2020）。从 MSPD 法分散填料筛选结果可以看出，正相色谱填料对目标化合物的检出量高于反相色谱填料，分析原因可能是正相色谱填料中的 Si−OH 等基团与化合物中的极性基团（−OH,−NH）形成氢键有关（王志兵，2015）。新型色谱填料 HILIC 对于紫杉烷类化合物的检出量低于正相色谱填料，分析原因可能为 HILIC 填料对强极性基团吸附能力较强，作用机理与偶极作用、氢键作用等多种作用力有关（徐露露等，2016），不适合极性较弱的紫杉烷类化合物的洗脱，其机理仍需进一步研究。目前，最常用的是反相色谱填料为十八烷基硅胶（Kristenson et al., 2006）可被应用于农药残留测定、环境基质样品分析（Sanchez et al., 2007），其吸附性能可通过其含水量或 PH 来调节（陈驰，2020）。在本文填料筛选实验过程中，正相色谱填料中碱性氧化铝对 10-DAB Ⅲ及 Taxol 的检出量高于其它正相分散剂，且经过其富集、净化后的样品萃取液澄清、透明，可能是与碱性氧化铝能够反应性的吸附红豆杉中诸如酸性酚类化合物等杂质有关。目前，碱性氧化铝作为分散剂对红豆杉进行净化、萃取鲜有报道，该研究结果为其在紫杉烷类化合物的定量分析提供一定的参考。

分散剂与样品质量比作为影响目标化合物萃取检出量的重要因素，其比例需根据萃取柱大小等情况进行调节，例如，Chu 等（2017）建立了基于基质固相分散萃取技术与高效液相色谱测定五味子中的木脂素类化合物的分析方法，五味子样品与分散剂质量比为 1∶2、甲醇洗脱时，分析物检出量最高。本研究选择样品质量为 0.25 g，碱性氧化铝的质量为 0.75 g 时，目标分析物可被分散剂充分吸附且易于洗脱，达到较好的萃取效果。

在基质固相分散萃取中，洗脱剂的选择需要考虑目标分析物与分散剂吸附的性质等因素，可采用单一或者混合有机溶剂（陈驰，2015），也可采用水作为洗脱剂（Bogialli et al., 2006）。在本研究中，我们选用了甲醇、乙腈、丙酮、乙醇四种极性较强溶剂对目标化合物进行洗脱，研究结果表明甲醇更适合于紫杉烷类化合物的洗脱，说明甲醇更适合于从碱性氧化铝中解析紫杉烷类化合物。在萃取过程中，洗脱剂体积、浓度等因素对目标分析物检出量也会产生影响，文献报道洗脱剂体积在 4～25 mL 范围内时大部分目标分析物均能被洗脱出来。例如，Salemi 等（2012）采用基质固相分散法结合气相色谱-电子捕获检测器对土壤中的 16 种有机氯农药及其衍生物进行定量分析。研究结果显示，以 10% C_{18} 的硅胶为分散剂，8 mL 氯仿-正己烷为洗脱剂，目标分析物检出量较高。本研究以 6 mL 甲醇洗脱，在节省溶剂的基础上，目标化合物可得到较高的检出量。

本文以碱性氧化铝为分散剂，6 mL 甲醇为洗脱剂，样品与分散剂的质量比为 1∶3 为基质固相萃取条件，建立了 MSPD-HPLC 同时测定云南红豆杉中 10-DAB Ⅲ、Taxol 的分析方法，且通过比较分析，证明碱性氧化铝作为正相填料，在基质固相萃取过程中对紫杉烷类化合物的具有净化、富集作用，并采取方法学实验对其可行性进行验证表明该方法回收率高，重现性好，在一定范围内具有良好的线性关系，适用于云南红豆杉中紫杉烷类化合物的快速分析。

参考文献

BAI PL, 2012. Fingerprint analysis and high quality germplasm screening of wild *Taxus chinensis var. mairei* from the different geographical areas[D]. Wuhu: Anhui Normal University: 1-2. [柏培磊，2012. 不同产地天然南方红豆杉指纹图谱分析及其优质种源筛选[D].芜湖：安徽师范大学：1-2.]

BARKER SA, 2000. Matrix solid-phase disperseon[J]. J. Chromatogr. A, 885(1-2): 115-127.

BARKER SA, LONG AR, SHORT CR, 1989. Isolation of drug residues from tissues by solid phase dispersion[J]. J Chromatogr A, 475(2): 353-361.

BOGIALLI S, CURINI R, Di Corcia A, et al., 2006. A rapid confirmatory method for analyzing tetracycline antibiotics in bovine, swine, and poultry muscle tissues: matrix solid-phase dispersion with heated water as extractant followed by liquid chromatography-tandem mass spectrometry[J]. J Agric Food Chem, 54(5): 1564-1570.

CHEN C, 2020. Study on matrix solid phase dispersion extraction of active ingredients from traditional chinese medicine[D]. Changchun: Changchun University of technology: 22-23. [陈驰，2020. 基质固相分散提取中药有效成分的研究[D].长春：长春工业大学：22-23.]

CHU C, WEI M, WANG S, et al., 2017. Micro-matrix solid-phase dispersion coupled with MEEKC for quantitative analysis of lignans in Schisandrae Chinensis Fructus using molecular sieve TS-1 as a sorbent[J]. J Chromatogr B, 1063: 174-179.

CUI HC, ZHENG WY, ZHANG ZH, et al., 2022. Determination and analysis of seven taxanes in different *Taxus* Species by HPLC method[J]. For Eng, 38(4): 118-124. [崔海超，郑文艺，张智慧，等，2022. 不同红豆杉属植物中 7 种紫杉烷类化合物的 HPLC 检测与分析[J]. 森林工程，38（4）：118-124.]

FENG YL, PU QY, WANG Y, et al., 2017. Dynamic change analysis of taxol content in the branch leaves of *Taxus media*[J]. Chin Tradit Pat Med, 39(2): 365-368. [冯永林，蒲擎宇，王勇，等，2017. 曼地亚红豆杉枝叶中紫杉醇含量动态变化分析[J]. 中成药，39（2）：365-368.]

FU YJ, SUN R, ZU YG, et al., 2009. Simultaneous determination of main taxoids in Taxus needles extracts by solid-phase extraction-high-performance liquid chromatography with pentafluorophenyl column[J]. Biomed Chromatogr, 23(1): 63-70.

GUO Y, QIAO ZQ, GUO SM, 2020. Validation of reuse effect of alkaline alumina extraction column in the test of sodium thiocyanate in milk and dairy products[J]. Food Eng, 157(4): 58-62. [郭芸，乔志强，郭尚梅，2020. 碱性氧化铝萃取柱在乳及乳制品中硫氰酸钠检验中的重复使用效果验证[J]. 食品工程，157（4）：58-62.]

JIANG LY, 2020. Application of new sample pretreatment technology in analysis of active components of traditional chinese medicine[D]. Hangzhou: Zhejiang University of technology, 9-10. [江璐依，2020. 新型样品前处理技术在中药活性成分分析中的应用[D].杭州：浙江工业大学：9-10]

KRISTENSON EM, UDO AT, RAMOS L, 2006. Recent advances in matrix solid-phase dispersion[J]. TrAC, Trends Anal Chem, 25(2): 96-111.

LI S, FU Y, ZU Y, et al., 2009. Determination of paclitaxel and other six taxoids in *Taxus* species by high-performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry[J]. J Pharm Biomed Anal, 49(1): 81-89.

LI X, JIANG Y, HAO WQ, 2020. Application of hydrophilic interaction chromatography in the analysis of polar compounds of chinese medicine[J]. J Shenyang Pharm Univ, 37(8): 764-768. [李欣，姜燕，郝旺青，2020. 亲水作用色谱在中药极性成分分析中的应用进展[J]. 沈阳药科大学学报，37（8）：764-768.]

LI YF, QIAO LQ, LI FW, et al., 2014. Determination of multiple pesticides in fruits and vegetables using a modified quick, easy, cheap, effective, rugged and safe method with magnetic nanoparticles and gas chromatography tandem mass spectrometry[J]. J Chromatogr A, 1361: 77-87.

LIU L, MA YK, SUN Y, et al., 2020. Simultaneous determination of four compounds in *Euphorbia fischeriana* by MSPD-UPLC[J]. Chin Tradit Pat Med, 42(6): 1520-1525. [刘雷，马玉坤，孙宇，等，2020. MSPD-UPLC 法同时测定狼毒大戟中 4 种成分[J]. 中成药，42（6）：1520-1525.]

LU YB, SHEN Q, DAI ZY, et al., 2011. Development of an on-line matrix solid-phase dispersion/fast liquid chromatography/tandem mass spectrometry system for the rapid and simultaneous determination of 13 sulfonamides in grass carp tissues[J]. J Chromatogr A, 1218(7): 929-937.

LUO H, NIE YK, FU YJ, et al., 2009. Determination of main taxoids in Taxus species by microwave-assisted extraction combined with LC-MS/MS analysis[J]. J Sep Sci, 32(2): 192-201.

MA SJ, LIU JH, WANG Y, et al., 2017. Comparative analysis on contents of 10-deacetyl-bacratin III, cephalomannine, taxol of *Taxus madia* from different habitats and growth years[J]. Chin Tradit Pat Med, 48(23): 4979-4985. [马生军，刘建慧，王颖，等，2017. 不同产地及生长年限曼地亚红豆杉中 10-脱乙酰基巴卡亭III、三尖杉宁碱、紫杉醇量的比较分析[J]. 中草药，48（23）:4979-4985.]

MA SZ, WU JB, 2006. Extraction and purification of 10-deacetyl baccatin Ⅲ from *Taxus mairei*[J]. Chin. J. New Drugs. 15(13): 1084-1086. [马淑桢，吴绵斌，2006. 南方红豆杉枝叶中 10-脱乙酰巴卡亭 III的分离与纯化[J]. 中国新药杂志，15（13）:1084-1086.]

SALEMI A, SHAFIEI E, VOSOUGH M, 2012. Optimization of matrix solid phase dispersion coupled with gas chromatography electron capture detection for determination of chlorinated pesticides in soil[J]. Talanta, 101: 504-509.

SANCHEZ-BRUNETE C, MIGUEL E, TADEO J L, 2007. Analysis of 27 polycyclic aromatic hydrocarbons by matrix solid-phase dispersion and isotope dilution gas chromatography-mass spectrometry in sewage sludge from the Spanish area of Madrid[J]. J Chromatogr A, 1148(2): 219-227.

WANG J, CHEN H, WANG ZD, et al., 2017. Study on the toxicity and pharmacological action of chinese yew[J]. China J Chin Mater Med, 30(4): 139-142. [王炯，陈涵，王章东，等，2017. 红豆杉的药理作用研究[J]. 中国中药杂志，30（4）：139-142.]

WANG ZB, 2015. Application of matric solid phase dispersion in extraction of active constituents of chinese medicines and harmful residues in foods[D]. Changchun: Jilin University: 67-68. [王志兵，2015. 基质固相分散在中药活性成分和食品中有害残留物提取中的应用[D].长春：吉林大学：67-68.]

WEI W, LI X W, SHI X L, et al., 2011. Matrix solid-phase dispersion extraction of alkaloids from the roots of aconitum *kusnezoffii Reichb*[J]. Chem Res Chin Univ, 27(1): 23-27.

WIANOWSKA D, HAINOS M Ł, DAWIDOWICZ A L, et al., 2009. Extraction methods of 10-deacetylbaccatin III, paclitaxel, and cephalomannine from *Taxus baccata L.* twigs: a comparison[J]. J Liq Chromatogr Relat Technol, 32(4): 589-601.

XU LL, CEHN LX, LUO Y, et al., 2016. Application progress of hydrophilic interaction liquid chromatography in the separation and analysis of natural products[J]. Chin J Pharm Anal 36(09):

1516-1525. [徐露露，陈路晓，骆宜，等，2016. 亲水作用色谱在天然产物分离分析中的应用进展[J]. 药物分析杂志，36(9): 1516-1525.]

YANG PH, HORWITZ SB, 2017, Taxol®: the first microtubule stabilizing agent[J]. Int J Mol Sci, 18(8):1733.

ZHANG J, LIAO HB, JIN YC, et al., 2011. UPLC simultaneous determination of three effective components in *Taxus media*[J]. Chin J Pharm Anal, 31(11): 2073-2077. [张静，廖海兵，金永春，等，2011. UPLC 法同时测定曼地亚红豆杉中 3 个有效成分的含量[J]. 药物分析杂志，31（11）：2073-2077.]

ZHAO CF, YU LJ, 2006. LC-ESI/MS determination of taxol and related taxanes in *Taxus chinensis(Pilger)Rehd*[J]. Chin J Pharm Anal, 26(1): 1-6. [赵春芳，余龙江，2006. 中国红豆杉中多种紫杉烷同时检测的液质联用方法的建立[J]. 药物分析杂志，26（1）：1-6.]

ZU YG, FU YG, LI SM, et al., 2006. Rapid separation of four main taxoids in *Taxus* species by a combined LLP-SPE-HPLC (PAD) procedure[J]. J Sep Sci, 29(9): 1237-1244.